

Estudio comparativo de 2 métodos para la determinación de productos de degradación de Fibrinógeno / fibrina "PDF" en suero

Dr. Fernando Atmella*
Dra. Marielos Alvarado*
Dra. Carmen L. Guerrero**
Sr. Alfredo M. Artavia***

INTRODUCCION

La acción proteolítica de la plasmina sobre el fibrinógeno-fibrina da lugar a la formación de varios fragmentos de peso molecular menor que la molécula inicial.

Marder (15), estableció que la molécula de fibrinógeno, cuyo P.M. es de 340.000 se degrada inicialmente en el fragmento X (P.M. 270.000) y en otros más pequeños llamados A, B y C. Por desdoblamiento del fragmento X se originan otros dos fragmentos, el Y (P.M. 165.000) y el D (P.M. 85.000). Posteriormente el Y se transforma en los fragmentos D y E, el último de P.M. 55.000. Todos estos fragmentos presentan determinantes antigénicos comunes al fibrinógeno (1,21).

La detección de estos productos de degradación del fibrinógeno-fibrina (P.D.F.), es de gran valor en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con el síndrome de coagulación intravascular diseminada (C.I.D.), en la etapa subclínica o en la variedad crónica del mismo.

Los PDF se determinan en suero por diferentes procedimientos que se agrupan en 3 categorías:

a. **Pruebas Inmunológicas:** emplean sueros específicos antifibrinógeno-antifibrina. Se incluyen en este grupo el Fi test (18,24) Thrombowelcotest (6,8), Ferreira y Murat (7), aglutinación con eritrocitos tani-ficados (16,17,19), y técnicas de inmunodifusión e inmunoelectroforesis (14,23).

b. **Pruebas de paracoagulación:** se basan en la polimerización espontánea del fragmento X⁰ y monómeros de fibrina, una vez que son liberados por diferentes compuestos de los complejos que forman con los fragmentos Y, D y E (20).

Entre las pruebas universalmente utilizadas de este grupo se encuentran la de sulfato de protamina en diluciones seriadas (10), y la de gelificación con etanol (4). Estas han sido objeto de variadas críticas por diferentes autores (3,9,12,25).

c. **Prueba de aglutinación del Estafilococo (11):** se basa en la presencia de un factor —diferente de la coagulasa— asociado a la pared bacteriana de ciertas cepas de *Staphylococcus* sp que se aglutinan en presencia de fibrinógeno, fragmentos X y monómeros de fibrina.

En las pruebas inmunológicas los sueros antifibrinógeno-antifibrina reaccionan con los fragmentos X, Y, D y E. A su vez los antisueros específicos para el fragmento E, reaccionan también con el fibrinógeno y los fragmentos X y Y; y los sueros específicos para el producto D, lo hacen también con el X y Y pero no con el E (2).

*Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica y Cátedra de Medicina, Hospital San Juan de Dios.

**Cátedra de Medicina, Hospital San Juan de Dios y Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica.

***Auxiliar de Laboratorio, Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense de Seguro Social.

Es el propósito de este trabajo, comparar dos técnicas de ese grupo: una muy utilizada en nuestro medio que emplea partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos antifragsmentados D y E del fibrinógeno (Thrombowellcotest) y que por consiguiente detecta fragmentos X, Y, D y E (2), contra otra —la de Ferreira— considerada entre las universalmente usadas (8), con la cual se reportó por primera vez PDF aumentados en un número grande de pacientes de diferentes condiciones clínicas (7).

Esta prueba es muy sencilla y práctica y se realizó empleando un suero antifibrina preparado en nuestro laboratorio.

MATERIAL Y METODOS

Obtención del suero:

Recolectar 2 ml de sangre en un tubo de ensayo que contiene un inhibidor de trispinafrijol de soya (aproximadamente 3600 N.F. unidades por tubo) y trombina bovina (20 NIH unidades por tubo). (Tubos preparados por Laboratorios Wellcome).

La sangre se puede recolectar también en tubos preparados de la siguiente manera (13):

0.05 ml de trombina bovina de 1000 U.I/ml

0.05 ml de tromboplastina tisular

0.05 ml de ácido épsilon amino caproico

Agregar a cada tubo 2,5 ml de sangre y mezclar rápidamente. Después de 15-30 minutos centrifugar 5 minutos a 3.000 r.p.m.

Pruebas para PDF en suero:

a. Método de partículas de látex sensibilizadas (Thrombowellcotest, Wellcome Research Laboratories, Bechenham, England) (T.W.).

b. Prueba de floculación de Ferreira y Murat

Se considera que en personas normales los valores de PDF por la prueba de floculación son inferiores a 15 ug/ml, por tanto, el suero sin diluir debe dar un resultado negativo.

En el T.W., las partículas de látex tienen una sensibilidad de 2 ug/ml, motivo por el cual el suero normal sin diluir da la reacción positiva, pero la dilución 1/5 debe ser negativa, o sea, que normalmente deben aparecer menos de 10 ug/ml (8).

Hemos considerado de mayor utilidad práctica reportar la prueba de Ferreira en ug/ml en vez de hacerlo en diluciones como lo hacen sus autores, ya que eso convierte la prueba en un análisis cuantitativo, facilitan-

do la interpretación de la misma. Para lograr lo anterior, se tomó un pool de plasma citratado al cual se le determinó la concentración de fibrinógeno, y al que se le practicaron diluciones seriadas, con el fin de ver la dilución mínima capaz de dar la prueba de floculación positiva, encontrándose que se podía detectar un mínimo de fibrinógeno de 15 ug/ml. Por tanto, si se multiplica dicho valor por la última dilución positiva de un suero, se obtendrá el resultado de los PDF en ug/ml.

Preparación de suero antifibrina:

Se utilizó la técnica de Lewis y col. (14), con las siguientes modificaciones: disolver 100 mg de la fibrina pulverizada en 4 ml de adyuvante completo de Freund en vez de $Al(OH)_3$. Inyectar esa cantidad a los conejos intramuscularmente cada 7 días por un lapso de 6 semanas, al cabo de las cuales el conejo desarrolló anticuerpos antifibrina, lo que se demostró mediante la prueba de Ferreira utilizando plasma diluido 1/40 en solución salina y suero normal como controles positivo y negativo respectivamente. Luego de mezclar 1 ml del antisuero con 0.2 ml de suero normal y dejar por un mínimo de 48 horas a 4°C para absorber los anticuerpos inespecíficos. Posteriormente practicar inmunoelectroforesis o contraímmunoelectroforesis al suero adsorbido, empleando suero y plasma normales. Si el antisuero es específico no se observará banda de precipitación con el plasma normal.

Nota: Se puede utilizar suero antifibrina comercial obteniéndose resultados similares (22)* ☆

* Behring Diagnostics, Department of Hoechst Pharmaceuticals Inc., Sommerville, New Jersey.
☆ Hyland, Division of Travenol Laboratories, Inc., Costa Mesa, California.

Grupo de pacientes:

Las determinaciones se realizaron en 50 controles, donadores de sangre, aparentemente normales, adultos, con edades comprendidas entre los 20 y 50 años, y en tres grupos de pacientes clasificados de la siguiente manera:

Grupo I: Pacientes en los cuales no existe causa clínica aparente para encontrar PDF positivos en suero.

Grupo II: Pacientes cuya entidad primaria podría o no condicionar PDF positivos en suero.

Grupo III: Pacientes que deberían tener PDF positivos de acuerdo al cuadro clínico que presentan.

En el cuadro 1 se especifican los tipos de trastornos que se incluyen en cada grupo.

RESULTADOS

El cuadro 2 muestra los resultados obtenidos en los 104 pacientes estudiados con las dos pruebas al igual que el gráfico de la Figura 1, el cual también incluye el coeficiente de correlación ($r:0.96$) y la ecuación de regresión obtenida $Y=1.135x + (-0.331)$.

El cuadro 3 representa el número de pacientes de cada grupo que dio positivas o negativas las pruebas de Ferreira y T.W.

De los 50 controles estudiados, tres dieron positivo el T.W. en la dilución 1/5 (10 mcgr/ml) y en la prueba de Ferreira los sueros control sin diluir dieron resultados negativos.

DISCUSION

Como se sabe, existen dos técnicas que son las más sensibles para detectar PDF en suero pero que resultan más imprácticas por su complejidad analítica. Estas son la inhibición de la hemaglutinación con glóbulos rojos tanados (19), y la del clumping del *Staphylococcus* (11). La primera detecta todos los PDF (X, Y, D y E) y monómeros de fibrina solubles (5,19), mientras que la del *Staphylococcus*, detecta únicamente fragmentos X y monómeros de fibrina (5,11). Ambas fueron comparadas con el T.W., Garvey et al. (8), encontraron un alto grado de correlación entre la inhibición de la hemaglutinación y el T.W. en 143 pacientes estudiados con diferentes condiciones patológicas que incluían enfermedad renal, enfermedad hepática, carcinomas, hipertiroidismo, embolia pulmonar y un grupo misceláneo. Obtuvieron un coeficiente de correlación de 0.83 considerado muy bueno por ellos.

Ellman et al. (6), encontraron una correlación excelente $r=0.82$ entre T.W. y el clumping del *Staphylococcus* en 126 determinaciones realizadas en personas normales, pacientes con sangrado activo y con otras patologías.

Nosotros lo comparamos con la prueba de Ferreira, una técnica de floculación muy sencilla, aceptada universalmente (8), cuya única complicación era la obtención del suero antifibrina, pero mediante el método de preparación del mismo expuesto anteriormente, este problema se eliminó, además de que puede ser adquirido fácilmente en el comercio.

Fue mediante las pruebas de Ferreira e inmunoelectroforesis que se detectó por

primera vez aumento de PDF en suero en un número grande de pacientes con diferentes entidades clínicas (7). En el trabajo citado de los 146 casos estudiados por los autores, se encontró positividad en 25 de ellos los cuales incluían complicaciones obstétricas, circulación extracorpórea, mordedura de serpientes y tromboflebitis asociada a trastorno maligno.

Landero et al. (13), en un estudio realizado en 100 pacientes obtuvieron la prueba positiva en personas con padecimientos infecciosos, enfermedades malignas, complicaciones obstétricas y con el síndrome de C.I.D., considerando la prueba de Ferreira, las de inmunoelectroforesis, paracoagulación y dosificación de fibrinógeno las más adecuadas para el estudio de C.I.D.

Al comparar en el presente trabajo el T.W. con la prueba de Ferreira se obtuvo una excelente correlación en los 104 pacientes estudiados (ver cuadro 2), lo cual se confirma en la figura 1 cuyo coeficiente de correlación (r) fue de 0.96.

Se considera que la diferencia que existe entre los ug/ml de PDF del T.W. y los de Ferreira que se muestran en el mismo cuadro, se deben en parte a las diferentes diluciones empleadas en cada caso, ya que el T.W. usa una dilución inicial de 1/5 y luego diluciones seriadas 1/2, mientras que la prueba de Ferreira sólo emplea diluciones seriadas 1/2.

Los títulos más altos se encontraron en los 21 pacientes que presentaban el síndrome de CID por diferentes causas como mordedura de serpiente, leucemia promielocítica, carcinoma gástrico, aborto séptico, septicemia por *clostridium*, shock séptico y otros. Estos pacientes que constituyen el grupo III estudiado, dieron en todos los casos las dos pruebas positivas (ver cuadros 1 y 3). En el cuadro 3 también se observa que en el grupo II (pacientes cuya entidad primaria podría o no condicionar PDF positivos en sueros), 20 presentaron ambas pruebas positivas mientras que 17 dieron únicamente el T.W. positivo a la concentración mínima de 10 ug/ml. Lo anterior se explica por el hecho de que la sensibilidad de la prueba de Ferreira utilizando el suero antifibrina preparado en nuestro laboratorio es de 15 ug/ml, por lo que es difícil detectar cifras inferiores. Además en el estudio realizado en 50 individuos normales, se encontró que un 6% de ellos presentaron la prueba de T.W. positiva a esa concentración, lo cual demuestra que ese valor no tiene importancia clínica significativa.

La sensibilidad del método de Ferreira puede variar levemente de acuerdo al título de anticuerpos que presente el suero anti-

fibrina obtenido en diferentes procesos de inmunización. La concentración óptima que hemos encontrado es de 15 ug/ml, valores que concuerdan con los obtenidos por los autores del método (14).

Una investigación clínica y de laboratorio, con un número mayor de pacientes y de pruebas, está en proceso de desarrollo, el cual será objeto de una posterior publicación.

Por el hecho de encontrar tan excelente correlación entre las pruebas de Ferreira y T.W. (método de referencia), nos permitimos recomendar la primera como un análisis de mucha utilidad, ya que tiene las ventajas de ser de bajo costo, rápida de emplear, equipo simple de laboratorio para su realización, por lo que se convierte en una alternativa muy buena para nuestro medio.

RESUMEN

Se hace un estudio comparativo de las pruebas de Ferreira y Thrombowellcotest (T.W.) para detectar productos de degradación de fibrinógeno-fibrina en el suero de 50 personas normales y en el de 104 pacientes con diferentes condiciones clínicas divididas en tres grupos: I-aquellos en los cuales no existe causa clínica aparente para encontrar

PDF positivos en suero. II-pacientes cuya entidad primaria podría o no condicionar PDF positivos en suero. III-aquellos que deberían tener PDF positivos de acuerdo al cuadro clínico que presentan.

La prueba de Ferreira se reportó en ug/ml en vez de hacerlo en diluciones como se hizo originlamente, lo cual es de mayor utilidad práctica ya que la convierte en una determinación cuantitativa.

En los individuos normales se encontró que 6% dieron la prueba de T.W. positiva a la dilución 1/5 por lo que presentaban más de 10 mcgr/ml de PDF en suero, mientras que con Ferreira todos fueron negativos ya que la sensibilidad de este método con el suero antifibrina preparado en nuestro laboratorio es de 15 ug/ml, valor que coincide con el obtenido por sus autores (14). En los 104 pacientes estudiados, se obtuvo una correlación muy buena entre ambas determinaciones (r:0.96), obteniéndose los títulos más altos con las dos pruebas en los 21 pacientes que presentaron el síndrome de C.I.D.

Por los resultados obtenidos recomendamos la de Ferreira por ser un análisis de bajo costo, rápido y que no necesita equipo especializado para su realización por lo que se convierte en una alternativa muy buena para nuestro medio.

Cuadro No. 1

TRASTORNOS CORRESPONDIENTES A CADA GRUPO ESTUDIADO

Grupo	# de Casos	Diagnóstico
I:	10	-Embarazadas normales
	3	-Sepsis urinaria
	1	-Dismenorreas
II:	50	-Preeclámpticas
	5	-Síndrome nefrótico
	10	-Cirrosis
	2	-Infarto miocardio
	2	-Insuficiencia placentaria
III:	21	-Síndrome de Coagulación Intravascular Diseminada por diversas causas primarias
Total Estudiados	104	

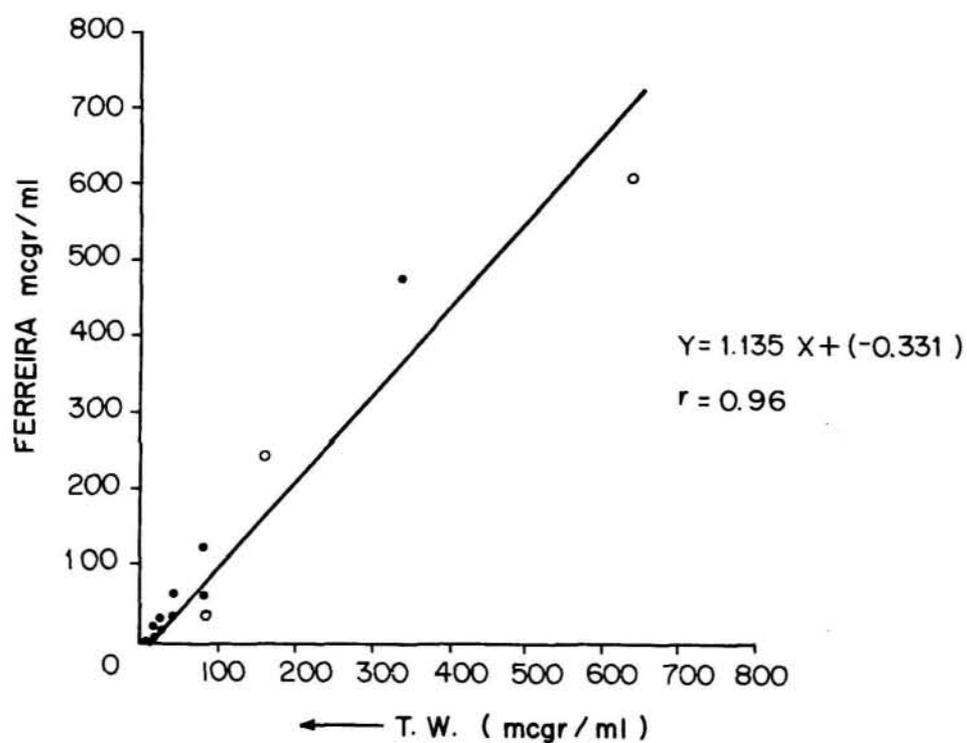


Fig. 1: Comparación de las 104 determinaciones de T.W. y Ferreira. (● Puntos múltiples, ○ Puntos sencillos)

Cuadro No. 2

RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS 104 PACIENTES ESTUDIADOS

T.W. mcgr/ml	Ferreira mcg/ml	# Casos
0	0	43
10	0	19
10	15	7
20	15	6
20	30	7
40	30	5
40	60	6
80	30	1
80	60	2
80	120	4
160	240	1
320	480	2
640	600	1
Total		104

T.W. = Thrombo-wellcotest.

Cuadro No. 3

RESULTADOS OBTENIDOS EN CADA UNO DE LOS GRUPOS DE PACIENTES ESTUDIADOS

Métodos	Grupo I	Grupo II	Grupo II	Total
T.W. y F. Negativos	11	32	0	43
T.W. y F. Positivos	1	20	21	42
T.W. (10 mcgr/ml) Positivo y F. Negativo	2	17	0	19

T.W. = Thrombo-Wellcotest

F = Ferreira

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALTMAN, R., ROUVIER, J.: Hemostasia y trombosis. Tomo I. Fisiología. Editorial Akadia, Buenos Aires, Argentina, 107 pp; 1975.
- 2.- ALTMAN, R., BRAUDE, R., ROUVIER, J.: Fibrinolisis: detección inmunológica de los productos líticos y su cinética. En resúmenes 2das. Jornadas Hematológicas IMSS, México, 1975.
- 3.- ATMETLLA, F.: La prueba de sulfato de protamina, una determinación controversial. Act.Méd.Cost. 19:141, 1976.
- 4.- BREEN, F.A. and TULLIS, J.L.: Ethanol gelation. A rapid screening test for intravascular coagulation. Ann. of Int. Med. 69 1197, 1968.
- 5.- COLMAN, R.W., ROBBOY, S.J. and MINNA, J.D.: Disseminated intravascular coagulation (DIC): An approach. Am.J.Med. 52:679, 1972.
- 6.- ELLMAN, L., CARVALHO, A., COLAM, R.W.: The Thrombo-wellcotest as a screening test for disseminated intravascular coagulation New Eng. J. of Med. 288: 633, 1973.
- 7.- FERREIRA, H.C. and MURAT, L.G.: An Immunologic method for demonstrating fibrin degradation products in serum and its use in the diagnosis of fibrinolytic states. Brit.J.Haemat. 9:299,1963.
- 8.- GARVEY, M.B. and BLACK, J.M.: The detection of fibrinogen/fibrin degradation products by means of a new antibody-coated latex particle. J.Clin.Path. 25:680,1972.
- 9.- GERRITS, W.B.J.; PRAKKE, W.M.; VANDERMEER, J., VREEKEN, J.: Causes of a negative ethanol gelation test in diffuse intravascular coagulation. Throm.Diath.Haemorrh 31:299, 1974.
- 10.- GUREWICH, W., HUTCHINSON, E.: Detection of intravascular coagulation by a serial dilution protamine sulfate test. Ann. of Int. Med. 75:895, 1971.
- 11.- HAWIGER, J.; NIEWIAROWSKI, S.; GUREWICH, V. and THOMAS, D.P.: Measurement of fibrinogen and fibrin degradation products in serum by staphylococcal clumping test. J.Lab.Clin.Med. 75:92,1970.
- 12.- JACOBSEN, C.D. and SOUTHERS, N.J.: Ethanol gelation and Protamine sulfate test. Comparison and critique. Thromb. Diath. Haemorrh. 29:130,1973.
- 13.- LANDERO, N.: Determinación de moléculas inmunológicamente semejantes al fibrinógeno en el diagnóstico de coagulación intravascular diseminada. Estudio comparativo con otras pruebas usadas con el mismo propósito. Laboratorios Clínicos de Puebla, Tesis de Grado en la Escuela de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Puebla, 1974.
- 14.- LEWIS, J.H.; WILSON, J.N. and BRANDON, J.M.: Counterelectrophoresis test for mole-

- cules immunologically similar to fibrinogen. *Am.J.Clin.Pathol.* 58:400,1972.
- 15.- MARDER, V.J. and SHULMAN, N.R.: High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin. I Physicochemical and immunological characterization. *J. of Biol. Chem* 244:2111, 1969.
 - 16.- MATSUSHINA, S. and TEZUKA, T.: A simplified method for detecting fibrinogen and its derivatives by tanned red cell hemagglutination inhibitor immune assay. *Tohoku, J. exp.Med.* 99:327, 1969.
 - 17.- MERTENS, B.F. McDUFFIE, F.C.; BOWIE, E.J.W. and OWEN Ch.A.: Rapid sensitive method for measuring fibrinogen split-products in human serum. *Mayo Clinic Proceedings* 44:114,1969.
 - 18.- MERSKEY, C.; KLEINER, G.J. and JOHNSON, A.J.: Quantitative estimation of split products of fibrinogen in human serum. Relation to diagnosis and treatment. *Blood* 28:1, 1966.
 - 19.- MERSKEY, C.; LALEZARI, P., and JOHNSON, A.J.: Tanned red cell hemagglutination inhibition immunoassay for fibrinogen-fibrin related antigen (fibrinolytic degradation products) in human serum. *Scand J. Haematol.* 13:83,1970.
 - 20.- NIEWIAROWSKY, S.; STEWART, G.J. and MARDER, V.J. Formation of highly ordered polymers from fibrinogen and fibrin degradation products. *Biochim.Biophys.Acta.* 221:326,1970.
 - 21.- RUIZ REYES, G.: Valoración de las pruebas de laboratorio en el descubrimiento de productos líticos del fibrinógeno. En resúmenes 2das Jornadas Hematológicas en IMSS, México, 1975.
 - 22.- RUIZ-REYES, G., LANDERO, N., ARMEN- TA-OLVER T.: Immunoelectrocataphoresis: an immunoelectrophoresis variant to detect fibrinogen electrophoretic abnormalities. *Rev.Invest.Clin.(Mex.)*. 30:337,1978.
 - 23.- SINGH, G.: Assessment of immuno-gel diffusion technique and fibrin degradation flocculation test in fibrinolysis investigations. *Ind.Jour.Med.Res.*. 57:1261. 1969.
 - 24.- THOMAS, D.P., NIWIAROWSKI, S.; MYERS, A.R., BLOCH, K.J. and COLMAN R.W.: A comparative study of four methods for detecting fibrinogen degradation products in patients with various diseases. *New Eng.J. of Med.* 283:633,1970.
 - 25.- YIP, M.I.B., LEE, S., SACH, F.J.: Nonspecificity of the Protamine test for disseminate intravascular coagulation. *Am.J.Clin. Pathol.* 57:487,1972.